



GERMINACIÓN DE SEMILLA Y OBTENCIÓN DE PLÁNTULAS DE *Vanilla planifolia* Andrews EN CONDICIONES *in vitro*

M. J. Torres-González, J. F. Aguirre-Medina, L. Iracheta-Donjuan

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Coyoacán, D.F. México CP 04010.

e-mail: aguirre.juan@inifap.gob.mx

RESUMEN

La vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews) es una especie de gran importancia en las culturas de Mesoamérica y en la actualidad ha recobrado el interés de los mercados internacionales por su uso en la industria alimentaria. Una de las limitantes en su propagación sexual es la baja germinación de la semilla, lo cual ha popularizado la multiplicación vegetativa con bajos índices de variación genética. En esta investigación se reporta el uso de diferentes medios (Yesuda y MS) de cultivo para propagación *in vitro*, para evaluar la germinación y formación de plantas en condiciones asimbióticas de semilla botánica de vainilla, aplicando dos variables de fotoperiodo. Los resultados indican que los nutrientes presentes en el medio de cultivo Yesuda a 10% en condiciones de incubación de fotoperiodo de 12 horas son más eficientes para la germinación de semillas de vainilla en un período más corto, en comparación con la respuesta observada en los otros tratamientos.

Palabras clave: germinación, asimbiótica, vainilla

INTRODUCCIÓN

La vainilla (*Vanilla spp.*) (Orquidaceae) es originaria de México y fue domesticada por la cultura totonaca en el estado de Veracruz; fue un aromático muy apreciado en las sociedades mesoamericanas precolombinas. En México existen pocas plantaciones y personas que se dedican a este cultivo a gran escala, y la demanda de este producto como saborizante se ha incrementado recientemente. Su distribución actual incluye plantaciones en Islas del Océano Índico, como La Reunión, Mauricio, Madagascar, Comoras, así como en Jamaica y otras Islas Occidentales (Havkin-Frenkel, 2007). Es un cultivo de alta rentabilidad en comparación con otros importantes de la zona tropical húmeda, como los cítricos (*Citrus spp.*) y el plátano (*Musa spp.*). El incremento de la producción, además de reducir las importaciones de vainilla y los sustitutos, permitiría su exportación y con ello captación de divisas para el país. En la producción comercial se cultivan solamente tres variedades: *Vanilla planifolia* Andrews o *Vanilla fragans* Salisbury, *Vanilla pompona* Schiede y *Vanilla tahitensis* Moore (Figura 1).

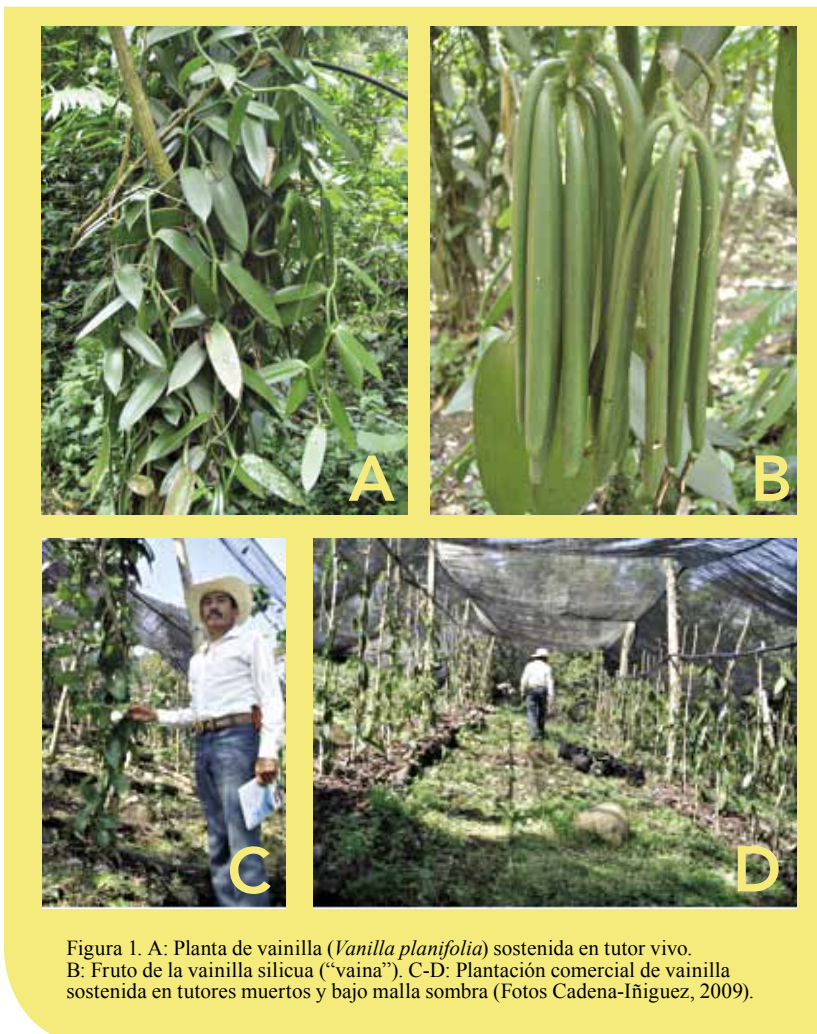


Figura 1. A: Planta de vainilla (*Vanilla planifolia*) sostenida en tutor vivo. B: Fruto de la vainilla silica (“vainá”). C-D: Plantación comercial de vainilla sostenida en tutores muertos y bajo malla sombra (Fotos Cadena-Iñiguez, 2009).

Además de las especies antes mencionadas, Soto (2003) indica la existencia de otras especies aromáticas que se cultivan localmente o se recolectan de forma silvestre, aunque no tienen alto valor económico, como es el caso de *V. pompona* en las Indias Occidentales, *V. chamissonis* Klotzsch en Brasil, *V. odorata* C. Presl. en América, *V. claviculata* (W. Wright) Sw., *Vanilla griffithii* Rchb. F., y *Vanilla abundiflora* J.J. Sm. en las Indias Occidentales y algunas regiones de Asia. Los frutos (silicuas) llamados popularmente vainas, son comercializados alrededor del mundo por su apreciable aroma. Tienen aroma característico y fuerte generado por la vainillina (Odox *et al.*, 2003).

La vainillina se utiliza principalmente en la repostería como aromatizante para pasteles, helados, dulces, chocolates y bebidas.

Es consumida por varios ramos industriales que lo utilizan como insumo para la elaboración de sus productos, como las industrias refresquera, pastelera, dulcera, galletera, así como de helados y concentrados. Además tiene utilidad en la confección de licores e incluso para el consumo casero. También se utiliza en la industria de cosméticos y perfumes. Esto la ha hecho la segunda especie más cara en el mercado mundial, junto al azafrán (Ranadivé, 1994; Abebe *et al.*, 2009). A nivel nacional los estados con producción de vainilla son Veracruz, Puebla, Oaxaca, Chiapas, Hidalgo, San Luis Potosí, Tabasco y Quintana Roo (SAGARPA, 2006). Veracruz es el principal productor con 454.08 toneladas producidas en 957.05 hectáreas en el año 2008, mientras que Chiapas obtuvo su mayor producción en 2004 con 0.8 toneladas en 50 hectáreas (SIAP, 2005).

Ante esta situación uno de los retos agronómicos en la vainilla es desarrollar tecnología sustentable para el cultivo en diferentes hábitats, además de intensificar el conocimiento relacionado con su hábito epífito de crecimiento, simbiosis micorrízica, dinámica de crecimiento y biología reproductiva (Hernández, 1997). Otras limitantes para establecer programas de mejoramiento es la baja germinación de la semilla botánica en condiciones naturales (Philip y Nainar, 1987), aunado a la baja tasa de autopolinización, limitante asociada a que la estructura floral de la vainilla presenta una barrera física llamada rostelo, la cual dificulta la polinización natural. Algunos ecotipos de *V. planifolia* en México registran tasas de autopolinización natural de entre 4-20% (Soto, 1999). En forma comercial no se usa la semilla botánica como fuente de propagación, lo cual ha generado baja variabilidad en los materiales comerciales debido principalmente a su reproducción asexual. Lo anterior repercute en demandas de incorporación de nuevos materiales biológicos, obtenidos mediante mejoramiento genético continuo, de tal forma que permiten incremento en rendimientos y adaptabilidad para ampliar su horizonte agroclimático (Alconero *et al.*, 1968).

Comercialmente la vainilla se multiplica por medios vegetativos a través de cortes de tallo o esquejes; sin embargo, es una multiplicación lenta y este método interrumpe el crecimiento de la planta madre y disminuye el rendimiento. Además, la colecta y siembra requiere de mucha mano de obra. Actualmente existen otros medios para la propagación de vainilla; entre las más usuales se encuentran la multiplicación *in vitro*. Algunos trabajos realizados al respecto se anotan en el Cuadro 1.

CUADRO 1. INVESTIGACIONES REALIZADAS ACERCA DE LA PROPAGACIÓN *IN VITRO* EN VAINILLA

Explante	Medio de cultivo	Respuesta	Referencia
Primer nudo	MS + 500 gr de caseína hidrolizada + 1 g L ⁻¹ Inositol + NAA + BA	Callos	Davidonis y Knorr (1991)
Meristemo radical	MS + 0.5 IBA + 1.0 BA	Múltiples brotes	Divakaran <i>et al.</i> (1996)
Nudo	WPM + 1 BAP	Múltiples brotes	Ganesh <i>et al.</i> (1996)
	MS	Raíces	George y Ravishankar (1997)
Yemas axilares	MS + 1 NAA + 2 BA	Múltiples brotes	Mary <i>et al.</i> (1999)
	½ MS + 2 g L ⁻¹ Carbón activado	Raíces	Pett y Kembu (1999)
Vainas	½ MS + 1 NAA + 1 – 2 BAP	Múltiples brotes	Mathew <i>et al.</i> (2000)
Puntas apicales, nudo	MS + 1 BAP	Múltiples brotes	Giridhar <i>et al.</i> (2001)
Puntas apicales, nudo	N69 + 0.5 BAP + 0.05 D- Biotina + 0.5 Ácido fólico	Múltiples brotes	Giridhar <i>et al.</i> (2003)
Nudo	MS + 2 IBA	Múltiples brotes	George y Ravishankar (2004)

Como puede apreciarse, los principales explantes utilizados son nodos, ápices y yemas axilares, con que varían desde la formación de callos y raíces, hasta la formación de brotes múltiples.

Este método de propagación clonal *in vitro* es útil cuando la producción de semilla y su germinación es baja. No obstante, si se compara este método con las técnicas de germinación asimbiótica *in vitro*, la cantidad de plantas es menor que el potencial que podría brindar la germinación de millones de semillas. Por tal motivo, lograr metodologías con altos porcentajes de germinación *in vitro* es de gran importancia no sólo para la propagación de vainilla, sino para contribuir a mantener la poca variabilidad existente en la especie (Cuadro 2).

CUADRO 2. RESULTADOS SOBRE LA GERMINACIÓN DE SEMILLA BOTÁNICA DE VANILLA PLANIFOLIA EN CONDICIONES *IN VITRO*

Tratamiento	Medio de cultivo	Respuesta	Referencia
Cultivo de semillas inmaduras escarificadas con ácido clorhídrico. Siembra efectuada en 10, 24, 40 50, 65 y 80 días después de polinización	Murasige-Skoog (MS)	Germinación ocurrida entre 101 y 108 días después de siembra	Parra (1987)
Usando silicuas verdes inmaduras.	Medio MS y Knudson	Concentraciones de 0.1 de MS y 0.5 de Knudson, indujeron germinación (4.72-3.21) entre 90 y 100 días	García <i>et al.</i> (2004)
Usando tratamientos de escarificación con H ₂ SO ₄ y HCl en semillas	Medio MS	Se obtuvo respuesta germinativa hasta las 21 semanas después de haber sido establecidas <i>in vitro</i>	Vivar (2004)
Desinfección con alcohol etílico al 70 % (1min) e hipoclorito de sodio 3 % por 10 minutos.	Medio MS adicionado con 0.05 mgL ⁻¹ de ANA, 0.1 mgL ⁻¹ de BAP.	Obtuvo respuesta de germinación en 72 días con promedio de 5.7 semillas germinadas por unidad experimental	León (2006)

Como puede apreciarse, la germinación fue tardada y variable, dependiendo de los tratamientos, o bien, bajo porcentaje de germinación. Con estos antecedentes, en el Laboratorio de Biotecnología (CERI-INIFAP) se han realizado diversos trabajos sobre la germinación *in vitro* de semilla botánica de vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews), con el fin de definir otra alternativa para acelerar y elevar el porcentaje de germinación y su propagación con fines de mejoramiento genético.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se evaluaron dos medios de cultivo a diferentes concentraciones de sales inorgánicas. Las silicuas (vainas) maduras aún sin dehiscencia fueron recolectadas en la zona de Tuxtla Chico, Chiapas; fueron desinfectadas con flameo de alcohol al 96% por 30 segundos e hipoclorito de sodio (cloro comercial al 10%) por 15 minutos. Las semillas asépticas fueron colocadas en medios de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1992), y Yasuda y Yamaguchi (1985), en concentraciones de 10, 50 y 100% (Figura 2). Las condiciones de incubación fueron fotoperiodo de 12 horas luz (50 µE.m⁻².s⁻¹) y oscuridad completa a 25 ±1 °C, bajo un arreglo experimental completamente al azar con 12 tratamientos y 10 repeticiones; cada repetición fue una caja petri con aproximadamente 600 semillas. Se aplicó comparación de medias mediante la prueba de Tukey (0.05).

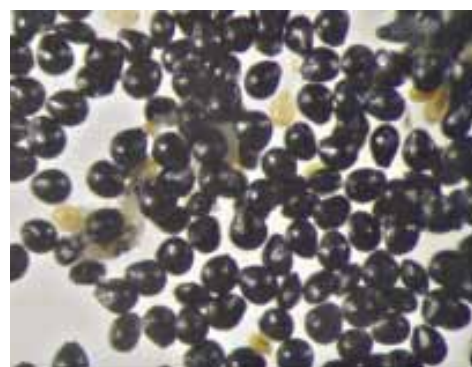


Figura 2. Corte longitudinal de la silicua y semilla de *Vanilla planifolia*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados mostraron que los medios de cultivo fueron susceptibles a contaminación. El medio de cultivo que presentó menor contaminación en sus tratamientos fue Yasuda (Figura 3A).

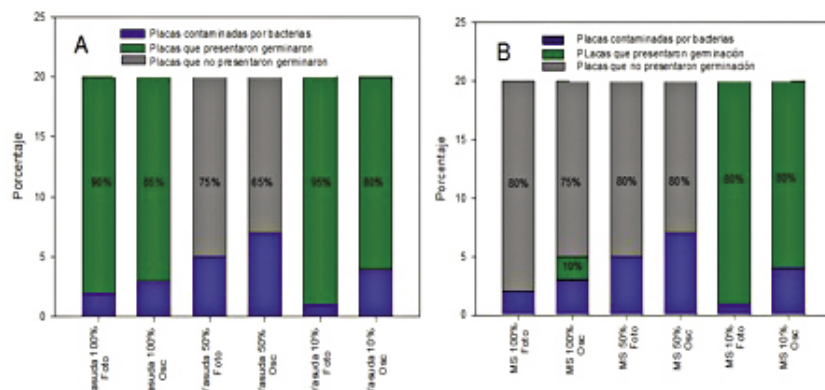


Figura 3. Porcentajes de germinación y contaminación de vainilla en diferentes tratamientos *in vitro*. A: Respuesta de semillas en diferentes concentraciones del medio Yasuda, B: Respuesta de semillas a diferentes concentraciones en medio MS.

Las semillas de vainilla en los tratamientos con medio Yasuda al 10% en condiciones de fotoperíodo presentaron la mayor germinación en 13 semanas de incubación (Figuras 4 y 5).

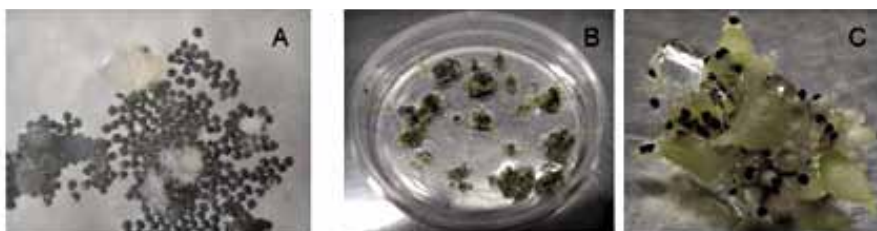


Figura 4. Germinación de semilla de *Vanilla planifolia* y formación de plántulas en diferentes tratamientos del medio Yasuda. A: semillas a 5 semanas de incubación. B-C: semillas a 10 semanas de incubación.

Por otra parte, los tratamientos con el medio Yasuda al 100% en ambas condiciones de incubación (fotoperíodo y oscuridad) presentaron rápida respuesta de germinación a los 21 días, aun cuando la cantidad de plántulas obtenidas fue menor que en el medio Yasuda al 10% (Figura 5).

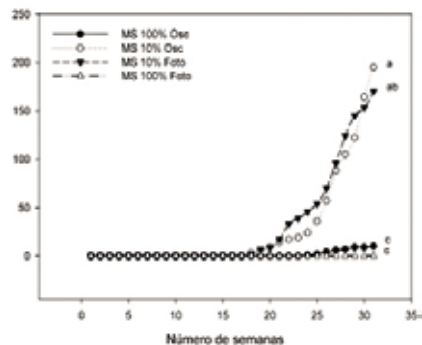


Figura 5. Respuesta de germinación y formación de plántulas en semillas de *Vanilla planifolia* a diferentes concentraciones del medio Yasuda, y dos condiciones de fotoperíodo. Valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí de acuerdo con la DHS de Tukey ($P \leq 0.05$).

Los tratamientos en medio MS al 100% indujeron una baja respuesta de germinación no mayor al 10%, mientras que los tratamientos con sales MS al 10% en ambas condiciones de incubación (fotoperíodo y oscuridad) presentaron hasta 80% de germinación a las 21 semanas (Figura 6 y 7).

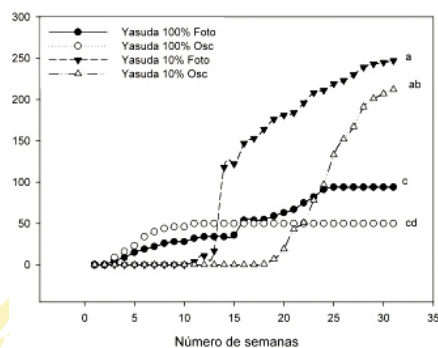


Figura 6. Respuesta de germinación y formación de plántulas en las semillas de *Vanilla planifolia* a diferentes tratamientos en medio MS. Valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí de acuerdo con la DHS de Tukey ($P \leq 0.05$).



Figura 7. Germinación y formación de plántulas en las semillas de *Vanilla planifolia* a diferentes tratamientos en medio MS. A-B: semillas a 20 semanas. C: semillas a las 20 y 25 semanas de incubación.

De igual forma, esta concentración de sales MS generó una mayor formación de plántulas (Figura 7), lo que hace que estos tratamientos requieran de más tiempo para la obtención de plántulas. Al comparar la respuesta de crecimiento en ambos medios de cultivo, el tratamiento con mayor crecimiento fue el medio Yasuda 10% en condiciones de fotoperiodo, ya que la respuesta de las semillas se observó en las 13 semanas con el mayor porcentaje de germinación y producción de plántulas. Adicionalmente, al colocarlas en un medio para su multiplicación, las semillas germinadas presentaron una mayor capacidad para la formación de mayor cantidad de masas con crecimiento de protocormos (Figura 8A y B). Así, al ser separadas y crecidas en un medio con carbón activado, fueron capaces de generar plántulas con raíces que, después de aclimatarse por periodos de entre 5 y 10 días en invernadero, produjeron plantas normales (Figura 8C).



Figura 8. Producción de masas de protocormos y plántulas. A-B: masas de protocormos en medio Yasuda a 25-30 semanas de incubación. C: plántulas formadas después del periodo de aclimatación.

CONCLUSIONES

Los nutrientes presentes en el medio de cultivo Yasuda al 10% en condiciones de incubación de fotoperiodo (12 horas) presentaron mayor efectividad en la germinación de semillas de vainilla en un período de tiempo más corto, en comparación con la respuesta observada en los otros tratamientos.

- Alconero R, E. G. Stone, and J. R. Cairns. 1968. Intensive cultivation of vanilla in Uganda. *Agronomy Journal*. 65: 44-46.
- Abebe Z., M. Ayelign, T. Alemayehu, and T. Wondyfraw. 2009. Efficient *in vitro* multiplication protocol for *Vanilla planifolia* using nodal explants in Ethiopia. *African Journal of Biotechnology* Vol. 8 (24) 6817-6821.
- Davidonis G., and D. Knorr. 1991. Callus formation and shoot regeneration in *Vanilla planifolia*. *Food Biotech.* 5:59-66.
- Divakaran N., A. Sajina, K. N. Babu, and P. N. Ravindran. 1996. Ovule culture of vanilla and its potential in crop improvement. *Proceedings of the National Seminar on Biotechnology of spices and Aromatics plants*, April, 24-25, Calicut India. pp: 112-118.
- FAO. <http://apps.fao.org/faostat> Consulta de bases de datos de producción mundial y comercio internacional de Vainilla.
- Ganesh D. S., H. L. Sreenath, and G. Jayashree. 1996. Micropropagation of vanilla through node culture. *J. Plantation Crops* 24: 16-22.
- García S., H. Sagastume, y L. Molina 2004. Evaluación de Medios de Cultivo para la Germinación y Desarrollo de Plántulas de Vainilla (*Vanilla planifolia* Jackson) *in vitro*. Tesis para la obtención de título de Ingeniero Agrónomo. Guatemala. CIAT.
- George P. S., and G. A. Ravishankar. 1997. *In vitro* multiplication *Vanilla planifolia* using auxillary bud explants. *Plant Cell Rep.* 16: 490-494.
- George P. S., and G. A. Ravishankar. 2004. Efficient micropropagation of *Vanilla planifolia* Andrews, under the influence of thidiazuron, zeatin and coconut milk. *Indian J. Biotechnol.* 3: 113-118.
- Giridhar P., B. O. Reddy, and G. A. Ravishankar. 2001. Silver nitrate influences *in vitro* shoot multiplication and root formation in *Vanilla planifolia* Andrews. *Curr. Sci.*, 81: 1166-1170.
- Giridhar P., D. V. Ramu, and G. A. Ravishankar. 2003. Phenyl acetic acid-induced *in vitro* shoot multiplication of *Vanilla planifolia*. *Trop. Sci.*, 43:92-95.
- Havkin-Frenkel D. 2007. Vanilla-The food of the Gods. *Agrofood industry hi-tech 60 Flavours*. Año 18 No. 1.
- Mary S., L. Thomas, R. V. Nair, and V. K. Mallika. 1999. *In vitro* seed culture of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews.) *J. Plant. Crops* 27:13-21.
- Mathew K.M., Y. S. Rao, G. L. George, R. Lakshmanan, and K. J. Madhusoodanan. 2000. *In vitro* propagation of *Vanilla tahitensis* Moore. *J. Spices Aromatic Crops*, 9:171-173.
- Murashige T., F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Odoux, E., J. Escoute, J. L. Verdeil, and J. M. Brillouet. 2003. Localization of-D- Glucosidase Activity and Glucovanillin in Vanilla Bean (*Vanilla planifolia* Andrews). *Annals of Botany* 92: 437-444.
- Parra Q. R. A. 1987. Cultivo *in vitro* y anatomía de óvulos de *Vanilla planifolia* Andrews. Colegio de Postgraduados, Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas, Centro de Fruticultura, Chapingo, México.
- Pett B., and A. B.Kembu. 1999. Factors influencing vanilla mass propagation *in vitro*. *Prap Rep. Pacific Regional Agric. Program.* 7:13-15.
- Phillip V.J., and S.A.Z. Nainar. 1987. Structural changes Turing the *in vitro* germination of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae). *Annals of Botany* 61: 139-145.
- Ranadive A. S. 1994. *Vanilla-Cultivation, Curing, Chemistry, Technology, and Commercial Products*, Spices, Herbs, and Edible Fungi; Charalambous, F. (ed). Elsevier Science B.V. Amsterdam. pp: 517-576.
- SAGARPA. 2006. Sistema producto Vainilla 2006. Logros y perspectivas de la vainilla en México. <http://www.sagarpa.gob.mx/agricultura/info/sp/ssp/vainilla.swf>
- SIAP (Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera). 2005. SIACON, SAGARPA. Consulta de Indicadores de Producción Nacional de Vainilla 2001- 2005. www.siap.sagarpa.gob.mx.
- Soto A. M. A. 1999. Filogeografía y recursos genéticos de las vainillas de México. <http://www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/resultados/InfJ101.pdf>. Cited 31 Mar 1999
- Soto A. M. A. 2003. Vanilla. In: Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN, (eds). *Genera Orchidacearum*. Vol. 3. Orchidoideae (part two) Vanilloideae. New York: Oxford University Press. pp: 321-334.
- Vivar T. M. 2004. Proyecto de Investigación denominado Germinación y propagación de *Vanilla planifolia* (vainilla Andrews) *in vitro*. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.
- Yasuda T. F. Y., and T. Yamaguchi. 1985. Embryogenic callus induction from *Coffea Arabica* leaf explants by benzyladenine. *Plant Cell Physiol.* 26: 595-597.